

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520131153437

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

新型电化学 DNA 传感器用于结核分枝杆菌  
及其耐药基因检测的实验研究

The new electrochemical DNA sensor for detection of  
*Mycobacterium tuberculosis* and its drug resistance gene

李茜茜

指导教师姓名: 洪国萍 教授

专 业 名 称: 微生物学

论文提交日期: 2016 年 5 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 5 月

新型电化学DNA传感器用于结核分枝杆菌及其耐药基因检测的实验研究

李茜茜

指导教师

洪国焱

教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(洪国焱 教授)课题(组)的研究成果,获得(洪国焱 教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(洪国焱 教授)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于    年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

## 摘 要

耐药结核分枝杆菌，尤其是耐多药结核分枝杆菌的出现给结核病的检测和治疗带来了巨大的挑战，对人类健康产生了极大威胁。目前临床上常用的结核病的检测方法分别存在操作繁琐、仪器昂贵、耗时较长及易污染等不足。电化学 DNA 传感器是近几年发展起来的一种新型生物传感器，因其简单、灵敏、特异性强、易微型化等特点受到研究者的青睐，已被应用于多个领域的研究。然而电化学 DNA 传感器易受其他因素的干扰造成结果不稳定。实验前期构建的 BSA 单分子层控制组装界面为基础的电化学 DNA 传感器，有效地提高了体系的稳定性。本文在前期研究基础上，构建了一种新型检测体系，即用于耐多药结核分枝杆菌耐药基因检测的双通道电化学 DNA 传感器，同时对其特异性、灵敏性等性能进行了研究。此外，将新型生物传感器用于结核分枝杆菌标本耐药性的检测，结果表明，生物传感器能够有效避免其他杂质的影响，实现结核分枝杆菌耐药性检测。

（一）以 BSA 单分子层控制组装界面为基础，构建双通道电化学 DNA 传感器，用于耐多药结核分枝杆菌耐药基因的快速检测。在组装界面分别组装两套不同的探针序列，识别不同的目标分子，信号探针标记生物素或链霉亲和素，通过生物素-链霉亲和素的相互作用在电极表面组装酶分子，安培法检测酶催化相关氧化还原反应，能够实现不同目标序列的同时检测。对双通道 DNA 传感器性能研究，表明该双通道 DNA 传感器具有较好的特异性和灵敏性，能够区分单碱基错配序列，对 *rpoB*，*katG*，*inhA* 三种耐药基因的检测限分别为  $4.33 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$ ， $3.28 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$ ， $4.02 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$ 。该双通道生物传感器不仅具有操作简单、低花费、灵敏度高、稳定性好、易微型化等特点，还能有效缩短检测时间，为结核病的诊治提供快速有效的依据。

（二）新型电化学 DNA 传感器用于耐多药结核分枝杆菌临床标本的检测。设计相应的引物扩增包含常见耐药基因突变位点的相应基因序列，新型电化学 DNA 传感器检测体系检测 PCR 扩增产物。由于 PCR 扩增产物处于双螺旋状态，在进行电化学检测时，杂交反应之前要进行变性过程，产生单链状态的目标序

列。加入过量的信号探针，竞争性地与变性之后形成的单链目标序列杂交。对 PCR 扩增产物的检测结果表明文中构建的电化学 DNA 传感器能够有效避免 PCR 产物中杂质的影响，可与目标 DNA 分子结合，特异性较好，能够区分野生型标本和突变型标本。

**关键词：**耐多药结核分枝杆菌；耐药基因；双通道电化学 DNA 传感器；PCR

## Abstract

The emergence of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, especially multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* has brought the huge challenge for detection and treatment of tuberculosis (TB), which causes the enormous threat to human health. Methods commonly used for detection of *Mycobacterium tuberculosis* also had some shortcomings respectively, for example tedious operation, expensive instrument, time consuming and easy pollution. Electrochemical DNA sensor is a new kind of biosensor developed in recent years. It has gotten the favour of the researchers and been applied in many fields because of its simple, sensitive and specific, easy to miniaturization and so on. However, electrochemical DNA sensor is unstable because it is susceptible to other factors. The electrochemical DNA sensor based on BSA assembled monolayer invented in the early study improved the stability of the biosensor effectively. In this study, a dual channel electrochemical DNA sensor was build based on the previous research. The dual electrochemical DNA sensor was applied to the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance gene, which was studied in the specificity, sensitivity and other properties. Furthermore, the new biosensor was applied for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* samples. The result demonstrated that biosensor can effectively avoid the influence of other impurities, realizing *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance test.

(1) A simple and rapid dual channel electrochemical DNA sensor was developed for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) based on a bovine serum albumin (BSA)-monolayer-based probe carrier platform. Two probes were designed and tethered on the electrode surface for recognizing target DNA. Enzyme molecular was absorbed in gold electrode surface by biotin-streptavidin interaction after hybridization. Several drug-resistant genes could be detected at the same time by electrochemical signal and colorimetric

change generated from enzymatic redox. The results showed that the dual channel electrochemical DNA sensor could complete the inspection of two genes at the same time due to no mutual influence between two hybridization reaction. The performance research of the biosensor showed that the biosensor had a good specificity and sensitivity. The detection limit of three drug resistance genes, i.e. *rpoB*, *katG*, *inhA* were  $4.33 \times 10^{-12}$  mol/L,  $3.28 \times 10^{-12}$  mol/L,  $4.02 \times 10^{-12}$  mol/L respectively. The dual channel electrochemical DNA sensor was not only simple operation, low-cost, high sensitivity, good stability, easy miniaturization and so on, but also can shorten the testing time effectively, which provide a quick and efficient method for the diagnosis and treatment of tuberculosis.

(2) The new electrochemical DNA sensor established in the study was applied for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* samples. Primers were designed to amplify the drug resistance gene of *Mycobacterium tuberculosis* and new electrochemical DNA sensor detected PCR amplification products. Because of PCR products being in the double helix, in the electrochemical detection, denaturation process must carry on before hybridization reaction to produce the target sequence of single status. Excess signal probe carried on hybridization reaction with the target sequence of single status competitively. The results demonstrated that probe could carry on hybridization reaction with target DNA molecules specifically, avoiding the effect of other impurity in the PCR products effectively. Nevertheless in the detection of PCR products, the hybridization efficiency is not high due to competing hybridization.

**Key words:** Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB); Drug resistance gene; Dual channel electrochemical DNA sensor; PCR



# 目 录

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| 摘 要.....                         | I   |
| Abstract.....                    | III |
| 英文缩写字表.....                      | 1   |
| 第一章 前言.....                      | 2   |
| 1.1 结核分枝杆菌耐药机制.....              | 2   |
| 1.2 结核分枝杆菌检测方法.....              | 8   |
| 1.3 立题依据.....                    | 12  |
| 参 考 文 献.....                     | 14  |
| 第二章 双通道电化学 DNA 传感器检测耐多药结核分枝杆菌的研究 | 25  |
| 2.1 序言.....                      | 25  |
| 2.2 实验仪器与试剂.....                 | 26  |
| 2.3 实验方法.....                    | 28  |
| 2.4 结果与讨论.....                   | 30  |
| 2.5 小结.....                      | 43  |
| 参 考 文 献.....                     | 45  |
| 第三章 新型电化学 DNA 传感器检测耐多药结核分枝杆菌标本的研 |     |
| 究.....                           | 49  |
| 3.1 序论.....                      | 49  |
| 3.2 实验仪器与试剂.....                 | 49  |
| 3.3 实验方法.....                    | 52  |
| 3.4 结果与讨论.....                   | 53  |
| 3.5 小结.....                      | 62  |
| 参 考 文 献.....                     | 63  |

|                |    |
|----------------|----|
| 第四章 全文结论 ..... | 65 |
| 附 录 .....      | 66 |
| 致 谢 .....      | 67 |

厦门大学博硕士论文摘要库

## Table of Contents

|  |     |
|--|-----|
| Abstract in Chinese.....   | I   |
| Abstract in English.....   | III |
| Table of abbreviation.....   | 1   |
| Chapter 1 Introduction.....  | 2   |
| 1.1 Mechanisms of drug resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....   | 2   |
| 1.2 Method for detection of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....  | 7   |
| 1.3 Foundation.....  | 12  |
| References.....  | 14  |
| Chapter 2 A dual channel DNA sensor for multiplex detection of two<br>multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> gene sequences.... | 25  |
| 2.1 Introduction.....  | 25  |
| 2.2 Apparatus and materials.....   | 26  |
| 2.3 Experimental methods.....  | 28  |
| 2.4 Results and discussion.....  | 31  |
| 2.5 Conclusion.....  | 44  |
| References.....  | 45  |
| Chapter 3 A new DNA sensor for detection of multidrug-resistant<br><i>Mycobacterium tuberculosis</i> samples.....                              | 49  |
| 3.1 Introduction.....  | 49  |
| 3.2 Apparatus and materials.....   | 49  |
| 3.3 Experimental methods.....  | 52  |
| 3.4 Results and discussion.....  | 53  |
| 3.5 Conclusion.....  | 62  |

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| <b>References.....</b>           | <b>63</b> |
| <b>Chapter 4 Conclusion.....</b> | <b>65</b> |
| <b>Appendix.....</b>             | <b>66</b> |
| <b>Acknowledgement.....</b>      | <b>67</b> |

厦门大学博硕士论文摘要库

## 英文缩写字表

| 英文缩写     | 英文全称   | 中文               |
|----------|--|------------------|
| ssDNA    | single stranded DNA                                | 单链 DNA           |
| dsDNA    | double stranded DNA                                | 双链 DNA           |
| BSA      | bovine serum albumin                               | 牛血清白蛋白           |
| HRP      | horseradish peroxidase                             | 辣根过氧化物酶          |
| TMB      | 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine                  | 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 |
| ALP      | alkaline phosphatase                               | 碱性磷酸酶            |
| p-APP    | 4-amino phenyl phosphate                           | 4-氨基苯基磷酸盐        |
| PCR      | polymerase chain reaction                          | 聚合酶链式反应          |
| AuE      | Au electrode                                       | 金电极              |
| I-T      | amperometric i-t curve                             | 安培电流-时间曲线        |
| PB       | phosphate buffer                                   | 磷酸盐缓冲液           |
| Tris-HCl | Tris (hydroxymethyl) aminomethane<br>hydrochloride | 三羟甲基氨基甲烷盐<br>酸盐  |

## 第一章 前言

结核病 (Tuberculosis, TB) 是一种古老的慢性传染病, 传播途径广泛, 临床症状表现多样, 对人类危害严重, 是世界上最重要的传染病之一。1882 年结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 就被德国细菌学家 Robert Koch 证实是引起结核病的病原菌<sup>[1]</sup>。该菌主要侵犯肺部组织引起肺结核, 但也可以感染机体其他器官。其主要定居细胞内, 直接在定居部位产生毒害作用<sup>[2]</sup>。另外, 结核分枝杆菌也可以在宿主体内存活数月至数年而不引起任何症状<sup>[3]</sup>, 这就导致许多结核患者未被发现而成为重要的传染源。全世界约有 1/3 的人口被感染。人体感染结核分枝杆菌后主要有三种临床表现: 一、机体较强的免疫系统彻底消灭了感染菌株; 二、感染菌株被控制但并未完全清除, 可间歇性的在巨噬细胞、肉芽肿及其他组织进行复制, 大多数结核分枝杆菌感染者以此状态存在, 但该类人群仍有发展为活动性 TB 的风险; 三、感染结核分枝杆菌后立刻表现出临床症状<sup>[4]</sup>。20 世纪 50 年代后, 随着异烟肼和利福平等一些抗结核药物的问世, 对结核病的控制取得了阶段性的胜利<sup>[5]</sup>。然而, 近几年随着耐药菌株的出现及艾滋病的流行, 结核病卷土重来, 再次成为威胁人类健康的全球性问题, 并成为一些艾滋病高发区的首要死因<sup>[6]</sup>。据 WHO 报道, 2014 年估计有 960 万人染上结核病, 并有 150 万人死亡, 其中 40 万人为艾滋病阳性 (WHO, 2015)。合并结核分枝杆菌感染急剧增加了艾滋病患者的死亡率。并且耐药菌株的出现给结核病的诊治带来了巨大的挑战, 使得结核病可能再次成为不治之症。由于结核病传播途径广泛, 部分漏检者即可成为重要的传染源, 危害公众健康。

### 1.1 结核分枝杆菌耐药机制

近几年, 一系列抗菌药物的不合理使用对耐药结核分枝杆菌产生了选择作用, 导致耐药结核分枝杆菌的比例不断增长。针对临床上常用的治疗药物, 包括异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇和吡嗪酰胺等都有耐药菌株的出现, 甚至出现了耐多药菌株和泛耐药菌株。耐多药结核分枝杆菌是指至少对两种最有效的抗结核一线药物异烟肼和利福平具有抗性的结核分枝杆菌。泛耐药结核分

枝杆菌是指除了具有耐多药结核分枝杆菌的特性外，还对喹诺酮类及至少一种注射类抗结核药物（卷曲霉素、卡那霉素、阿米卡星）有抗性的结核分枝杆菌<sup>[7]</sup>。耐药结核分枝杆菌的出现为临床诊断和治疗结核病带来了新的挑战。目前，有关结核分枝杆菌耐药机制的研究已有大量文献报导。

### 1.1.1 固有耐药机制

结核分枝杆菌具有独特的细胞壁结构，除了具有大多数细菌都具有的肽聚糖层外，还具有独特、复杂的脂质层，共同组成了结核分枝杆菌的渗透屏障。同时细胞膜上的外排泵和本身产生的  $\beta$ -内酰胺酶使该菌本身就对四环素、氟喹诺酮类、氨基糖苷类等抗结核药物存在一定的抗性<sup>[8]</sup>。*ppsA*、*pks12* 和 *pks3* 基因参与脂类成分结核菌醇二分支菌酸的合成<sup>[9]</sup>。*ppsA* 基因和 *pks12*、*pks3* 基因中任意基因同时缺失都会影响结核分枝杆菌对药物的敏感性。

### 1.1.2 基因变异导致耐药性

尽管受许多其他因素的影响，但高水平的耐药通常都与相关基因的改变有关<sup>[10]</sup>。此外，由于结核分枝杆菌很少有机会与其他品系接触进行遗传物质交换，所以它的耐药性的获得不是通过质粒、转座子、整合子等移动性元件的转移所致，而是染色体突变的结果。基因突变通常包括以下几种类型：1.编码药物目标蛋白及参与药物代谢的酶分子基因突变，该类型突变研究较多，是最常见的耐药突变类型。2.降低细胞通透性或激活药物外排泵的突变。3.补偿性突变，菌株发生耐药突变后通常会降低其生存适应能力，而该突变的发生可以增强其生存适应能力进而存活下来。4.突变表型能够增加有利突变发生的概率。目前，已知的突变能够解释部分结核分枝杆菌的耐药性，但还有相当一部分临床分离耐药菌株耐药机制未被解释，可能与其他突变有关，需进一步深入研究。针对不同的抗菌药物，耐药性突变类型及位点不同。

#### 1.1.2.1 耐异烟肼的机制

异烟肼（Isoniazid, INH）是一种酰肼类抗结核药物，以被动扩散的方式进入结核分枝杆菌体内，被过氧化氢-过氧化物酶活化产生自由基，攻击结核分枝杆菌细胞壁中的分枝菌酸，DNA，脂类等成分<sup>[11]</sup>。据报导，异烟肼耐药性的产生是一个非常复杂的过程，与 *katG*、*ahpC*、*inhA* 和 *kasA* 等多个基因的突变有

关<sup>[12,13]</sup>。也有研究表明异烟肼耐药性的产生主要与 *katG*, *ahpC*, *inhA* 基因的改变有关, 与 *kasA* 基因关联不大<sup>[14]</sup>。目前其耐药机制尚未完全研究清楚, 还需进一步研究。

*katG* 基因编码过氧化氢酶-过氧化物酶, 该酶能活化异烟肼产生自由基, 使其发挥抑菌作用。*katG* 基因发生突变后, 过氧化氢酶-过氧化物酶不能正常表达, 导致异烟肼不能被进一步活化发挥抑菌活性。大量研究表明 *katG* 基因的 315 位与过氧化氢酶-过氧化物酶的活性位点密切相关, 该位点突变常常引起菌株异烟肼耐药性的产生, 可以作为分子标记用于结核分枝杆菌异烟肼耐药性的检测<sup>[15-17]</sup>。另外, 密码子 107、321 位的色氨酸, 108、270、276 位的组氨酸, 104、409、463 位的精氨酸等也都是过氧化氢酶-过氧化物酶结合和催化部位的关键位点, 但关于这些位点与异烟肼耐药性产生关系的研究较少。尽管结核分枝杆菌异烟肼耐药性的产生主要与 *katG* 结构基因的突变有关, 调控基因对结核分枝杆菌耐药性产生的影响也是不可忽视的, *katG* 基因的表达受上游 *furA* 基因的调控。Siu 等鉴定的高水平耐药菌株 GB005 并没有检测到 *katG* 结构基因的突变, 而 *katG* 基因表达水平及表达产物的催化活性却较 H37Rv 明显下降, 经研究发现 134bp *furA* 基因上游片段的缺失导致了 *katG* 基因的表达下调<sup>[18]</sup>。

*inhA* 基因突变也是异烟肼耐药菌株常见的突变, 占异烟肼临床耐药菌株的 10%~35%。*inhA* 基因编码烯酰基-酰基载体蛋白还原酶, 该酶参与分枝菌酸合成过程中脂肪酸链的延长<sup>[19]</sup>。活化的异烟肼能与该酶活性部位的 NAD 辅因子结合, 削弱 NADH 和 *inhA* 酶的亲和力, 使 *inhA* 酶无法正常发挥作用, 阻止了长链脂肪酸的缩合, 导致分枝菌酸合成过程受阻。基因调控区域突变会导致 *inhA* 基因表达上调, 异烟肼发挥抑菌作用所需的浓度变大。常见的基因调控区域的突变发生在 *inhA* 基因启动子-15 位 (C→T)<sup>[20]</sup>, 许多异烟肼耐药性检测都将该位点的突变作为异烟肼耐药的分子标记<sup>[17,21,22]</sup>。另外, *inhA* 结构基因突变易导致表达产物与异烟肼亲和力降低, 突变率较高的部位是 280 位 Ser→Ala、94 位 Ser→Ala、90 位 Ile→Pro。

*ahpC* 基因编码烷羟基过氧化氢还原酶, 它能排除机体的过氧化物, 保护结核分枝杆菌免受过氧化物的损害。*anhC* 基因启动子区的突变, 可能导致 *ahpC* 基因的过量表达, 过量的烷羟基过氧化氢还原酶使细菌能及时清除异烟肼活化



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.